

**T.C.  
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YAĞ DOKUSUNDA KATALAZ AKTİVİTESİ ÖLÇÜMÜ İÇİN  
FARKLI İZOLASYON YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

**Sinem USTA**

**TEZ DANIŞMANI  
PROF. DR. AHMET ALVER**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

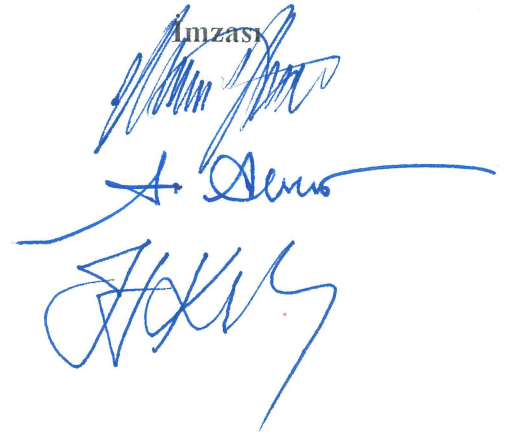
**RİZE-2019**

T.C.  
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YAĞ DOKUSUNDA KATALAZ AKTİVİTESİ ÖLÇÜMÜ İÇİN FARKLI  
İZOLASYON YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

Prof. Dr. Ahmet ALVER danışmanlığında, Sinem USTA tarafından hazırlanan bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla oluşturulan jüri tarafından 08/07/2019 tarihinde Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	Unvanı Adı Soyadı
Başkan	: Prof. Dr. Murat KÜÇÜK
Üye	: Prof. Dr. Ahmet ALVER
Üye	: Doç. Dr. Hülya KILIÇ YILMAZ

Amzası  


  
Prof. Dr. Hüseyin Avni ÖYDÜ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ



## ÖNSÖZ

Bu bölüme başladığımda tanıştığım her zaman pozitifliği ve güler yüzüyle içimizi ısıtan, tuttuğu ışığı ile bize yol gösteren, aramızda olmasa da hep yanımda hissettiğim sevgili ve değerli hocam Prof. Dr. Hasan EFE' ye,

Tez çalışmam sırasında danışmanlığımı yürüten, beni yönlendiren, tüm bilgi ve deneyimlerini hoşgörüsüyle sunan değerli hocam Prof. Dr. Ahmet ALVER' e,

Ders aldığım süre boyunca deneyimlerinden ve engin bilgilerinden faydalandığım saygıdeğer Prof. Dr. Adnan YILMAZ, Prof. Dr. Hüseyin Avni UYDU ve Doç Dr. Selçuk DEMİR' e,

Tez savunmamda beni sabır ile dinleyen saygıdeğer tez jurilerim Prof. Dr. Murat Küçük ve Doç. Dr. Hülya KILIÇ YILMAZ' a,

Tez çalışmam sırasında yardımlarını esirgemeyen hocalarım Uzm. Sibel MATARACI KARAKAŞ' a, Dr. Öğr. Üyesi Mehtap ATAK ile bölüm arkadaşlarım Pınar KAPLAN, Arş. Gör. Esra PINARBAŞ' a, değerli, kardeşim bildiğim arkadaşlarım Hanife TURAN, Ayşe ALIŞKAN, Zehra ÖZCİFCİ, Şafak CAM' a ve Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına,

Ayrıca tüm öğrenim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini yanımda hissettiğim, her koşulda yanımda olan babam Ramazan USTA, annem Güngör USTA ve kardeşim Betül USTA' ya sonsuz teşekkür ederim.

**Sinem USTA**

## TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Tarafımdan hazırlanan ‘Yağ Dokusunda Katalaz Aktivitesi Ölçümü İçin Farklı İzolasyon Yöntemlerinin Karşılaştırılması’ başlıklı bu tezin, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesindeki hususlara uygun olarak hazırladığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal işlemi kabul ettiğimi beyan ederim.  
08/07/2019

  
Sinem USTA

*Uyarı: Bu tezde kullanılan özgün ve/veya başka kaynaklardan sunulan içeriğin kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.*

## ÖZET

### YAĞ DOKUSUNDA KATALAZ AKTİVİTESİ ÖLÇÜMÜ İÇİN FARKLI İZOLASYON YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

SİNEM USTA

**Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı  
Yüksek Lisans Tezi  
Danışmanı: Prof. Dr. Ahmet ALVER**

Son zamanlarda yapılan çalışmalar yağ dokusunun yalnızca enerji deposu olmadığını, bunun yanında endokrin bir organ olduğunu gösterdi. Beyaz yağ dokusu, vücutta bol oranda bulunmasının yanında ihtiyaç fazlası enerjiyi trigliserit halinde depolayarak sakladığı ve enerji homeostazına katkıda bulunduğu bilinmektedir. Vücutta artan yağ kitlesi sonucu oluşan obezite artmış oksidatif stres ve düşük dereceli kronik inflamasyonla birlikte gözlenir. Antioksidan enzimler, daha az aktif radikal oluşmasına yol açarak veya serbest radikal zincir reaksiyonunun proteinler, lipidler, karbonhidratlar ve DNA üzerine hasarını azaltarak oksidatif stresin şiddetini bastırmaya yardımcı olan proteinlerdir. Katalaz enzimi önemli bir oksidan kaynağı olan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi su ve oksijene parçalayarak oksidatif stresin oluşmasını engeller. Yağ dokusunun yüksek lipit ve düşük protein içeriğine sahip olması, lipit interferansının yüksek olması gibi durumlar bu dokuda protein izolasyonunu ve ölçümünü zorlaştırmaktaydı. Çalışmamızda, yağ dokusunda farklı protein izolasyon yöntemlerinin kullanılmasının CAT aktivitesi üzerine etkisinin incelenmesi ve ölçüm için gerekli şartların ortaya konulması amaçlandı. Katalaz aktivitesi ölçümleri Aebi yöntemi ile yapıldı. Sıçanlardan retroperitoneal yağ dokusu çıkarılıp üç farklı homojenizasyon yöntemi için anıldı. Homojenizasyon 1 (H1)'de organik çözücü olarak kloroform/metanol, homojenizasyon 2 (H2)'de ve homojenizasyon 3 (H3)'de sadece kloroform kullanıldı. Yapılan değerlendirmeler sonucunda H1 yönteminin ortalama spesifik aktivite değerleri diğer iki yönteme göre daha yüksek bulundu. Sonuç olarak, retroperitoneal yağ dokusunda H1 yönteminin CAT enzim aktivitesi ölçümünde daha uygun olabileceği kanaatine varıldı.

**2019, 30 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Yağ Dokusu, Antioksidan Enzimler, Oksidatif Stres

## **ABSTRACT**

### **COMPARISON OF DIFFERENT ISOLATION METHODS FOR CATALASE ACTIVITY MEASUREMENT IN ADIPOSE TISSUE**

**SİNEM USTA**

**Recep Tayyip Erdoğan University  
Graduate School of Health Sciences  
Department of Medical Biochemistry  
Master Thesis  
Supervisor: Prof. Dr. Ahmet ALVER**

Recent studies have shown that adipose tissue is not only an energy store, but also an endocrine organ. White adipose tissue, which is abundant in the body, stores excess energy in triglyceride form and contributes to energy homeostasis. Obesity caused by the increased adipose tissue mass related with oxidant antioxidant in balance and low grade chronic inflammation. Antioxidant enzymes are proteins that help suppress the oxidative stress by causing less active radical formation or by reducing the damage of the free radical chain reaction on proteins, lipids, carbohydrates and DNA. The catalase enzyme breaks down  $H_2O_2$ , an important source of oxidant, into water and oxygen, thus preventing the formation of oxidative stress. As fat tissue has high lipid and low protein content which leads to high lipid interference. Hence, protein isolation and measurement are difficult in fat tissue. In this study, we aimed to investigate the effect of using different protein isolation methods from adipose tissue on eventual CAT activity and to determine the necessary conditions for measurement. . Catalase activity was measured by Aebi method. Retroperitoneal fat tissue was obtained from the rats and used for three different homogenization methods. In homogenization 1 (H1) chloroform / methanol was used as the organic solvent, in homogenization 2 (H2) and in homogenization 3 (H3) only chloroform was used. The result of the evaluations revealed that the average specific activity values of H1 method were elevated than the other two methods. It was concluded that H1 method in retroperitoneal adipose tissue may be more suitable for CAT enzyme activity measurement.

**2019, 30 pages**

**Keywords:** Adipose tissue, Antioxidant enzymes, Oxidative stress

## İÇİNDEKİLER

<b>ÖNSÖZ</b> .....	<b>I</b>
<b>TEZ ETİK BEYANNAMESİ</b> .....	<b>II</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>III</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>IV</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>V</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>VII</b>
<b>TABLolar DİZİNİ</b> .....	<b>VIII</b>
<b>SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>IX</b>
<b>1. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>1</b>
1.1. Giriş .....	1
1.2. Serbest Radikaller.....	2
1.3. Serbest Radikallerin zararları .....	4
1.3.1. Hidrojen peroksit (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	4
1.4. Antioksidan Sistemler .....	5
1.5. Katalaz .....	6
1.5.1. Katalazın Tarihçesi .....	7
1.5.2. Katalitik Mekanizması .....	7
1.5.3. Hücresel görevi.....	8
1.5.4. Dokular Arasındaki Dağılımı .....	9
1.5.5. Katalaz uygulamaları .....	10
1.6. Yağ Dokusu .....	10
1.6.1. Yağ Dokusu, Oksidatif Stres ve İnflamasyon .....	11
<b>2. YAPILAN ÇALIŞMALAR</b> .....	<b>12</b>
2.1. Kullanılan Cihazlar, Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Ticari Kitler .....	12
2.2. Kullanılan Hayvanlar .....	13

2.3. Beyaz Yağ Dokusu Homojenizasyon Yöntemi Seçimi .....	13
2.3.1.Homojenizasyon Yöntemi 1 .....	13
2.3.2.Homojenizasyon Yöntemi 2 .....	14
2.3.3.Homojenizasyon Yöntemi 3 .....	14
2.4. Katalaz Aktivite Tayininde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması .....	15
2.5. Deneyin Yapılışı .....	15
2.5.1.Protein Miktar Tayini .....	15
2.6. İstatiksel Analiz .....	17
<b>3. BULGULAR .....</b>	<b>18</b>
3.1. Retroperitoneal Yağ Dokusunda Katalaz Ölçüm Sonuçları .....	18
3.2. Yöntemlere göre spesifik aktivite sonuçları (k/mg protein) .....	19
<b>4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR .....</b>	<b>21</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>26</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>30</b>



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. $H_2O_2$ ' nin üç boyutlu konfigürasyonu .....	4
Şekil 2. Katalaz reaksiyonu .....	7
Şekil 3. Fenton reaksiyonu .....	7
Şekil 4. Katalaz reaksiyonunun mekanizması .....	8
Şekil 5. Katalazın net reaksiyon denklemi .....	8
Şekil 6. Homojenizasyon yöntemi 1 (H1) protein standart grafiği.....	16
Şekil 7. Homojenizasyon yöntemi 2 (H2) protein standart grafiği.....	16
Şekil 8. Homojenizasyon yöntemi 3 (H3) protein standart grafiği.....	17
Şekil 9. Üç homojenizasyon yönteminin spesifik aktiviteleri .....	20

## TABLULAR DİZİNİ

<b>Tablo 1.</b> Oksijen ve nitrojen kaynaklı reaktif oksijen türleri .....	3
<b>Tablo 2.</b> Endojen ve eksojen içerikli antioksidanlar .....	6
<b>Tablo 3.</b> Kullanılan cihazlar ve malzemelerin listesi .....	12
<b>Tablo 4.</b> Katalaz aktivitesi ölçümü için reaksiyon karışımı .....	15
<b>Tablo 5.</b> Kullanılan 3 yöntemde elde edilen protein miktarı sonuçları .....	18
<b>Tablo 6.</b> 1. Homojenizasyon (H1) yöntemine göre spesifik aktivite sonuçları.....	18
<b>Tablo 7.</b> 2. Homojenizasyon (H2) yöntemine göre spesifik aktivite sonuçları.....	19
<b>Tablo 8.</b> 3. Homojenizasyon (H3) yöntemine göre spesifik aktivite sonuçları.....	19



## SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

BCA	Bisinkoninik asit
BSA	Bovine serum albumini
CAT	Katalaz
GP <sub>x</sub>	Glutasyon peroksidaz
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen Peroksit
HOCl	Hipokloröz asit
kDa	Kilo dalton
NADPH	Nikotin amid adenin dinükleotit fosfat
RNS	Reaktif Nitrojen Türleri
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
rpm	Revolutions Per Minute
SOD	Süperoksit dismutaz
TG	Triaçilgliserol
UV	Ultra Viole

# 1. GENEL BİLGİLER

## 1.1. Giriş

İnsan vücudu yaratılıştan gelen özelliklerinden ötürü sürekli hareket eden bir organizmadır. İnsanlar diğer canlılar gibi doğal şartlarla baş edecek, kendini savunabilecek, güç durumlarda dahi ihtiyaçlarını karşılayabilecek bir donanıma sahiptir. İçinde bulunduğumuz yüz yıla gelinceye kadar bu yapının gereği olarak insanlar sürekli hareketli bir hayat tarzı yaşamış ve pek çok işi yerine getirmek için kas gücünü kullanmak zorunda kalmıştır. Teknolojinin getirdiği kolaylıklar ve sağladığı olanaklar sayesinde insanlar her geçen gün, daha sedanter bir hayat tarzını tercih etmişlerdir. Bu yaşam tarzı toplumdaki insanları giderek hareketsizleştirmekte ve organizmanın fonksiyonel kapasitelerini sınırlamaktadır. İnsan organizması hareketsiz kaldıkça ve beslenme alışkanlıklarının değişmesine bağlı olarak, alınan enerji kaynaklarının yeterince harcanmaması sonucu obezite şekillenmektedir (Kıyıcı, 2006).

Fazla enerji alınması nedeniyle yağ dokusu artışı olarak tanımlanan obezite, dünyada ve ülkemizde gün geçtikçe artan ve sağlığımızı tehdit eden önemli bir faktördür. Obez kişilerde aşırı beslenmeye bağlı olarak metabolik yük ve bunun sonucunda metabolik yolların aşırı yüklenmesine bağlı olarak serbest radikal oluşumu artmaktadır. Böylelikle reaktif oksijen türlerinin (ROS) artışının adipokinler tarafından indüklenmesi oksidatif strese neden olmaktadır. Serbest radikallerin neden olduğu olumsuzluklar ortadan kaldırmak için hücre organellerini ve membranlarını korumak ile hücrelerde görevli çeşitli enzimatik ve nonenzimatik antioksidan savunma sistemleri vardır. Çoğu memelinin antioksidan savunma sistemleri, kronik olarak maruz kaldıkları oksidanlara karşı adapte olabilme yeteneğine sahiptirler. Fiziksel egzersizler sırasında oluşabilecek oksidatif hasarın boyutu sadece serbest radikal üretimi ile değil aynı zamanda antioksidanların savunma kapasitesi tarafından da belirlenmektedir. Vücutta üretilen ROS' lara karşı ilk savunma hattını SOD, CAT ve GP<sub>x</sub> sağlamaktadır (Kahraman, 2013).

Serbest radikaller ya moleküldürler ya da dış yörüngelerinde eşleşmemiş elektronlar içeren moleküler bileşenlerdir. Bu bileşenler komşu moleküllerle oksidasyon

yaparak elektron yapılandırmayı sağlamaştırmaya çalışırlar. Serbest radikallerin iletimdeki rollerini göz önünde bulundurduğumuzda, serbest radikaller dönüşümsüz oksidatif stresin bir parçasıdır (Özcan vd., 2015).

Antioksidanlar, serbest radikallerle tepkimeye girerek bunların başlattığı zincir reaksiyonu durduran ve böylece vücudumuzdaki hayati bileşenlerin zarar görmesini engelleyen moleküllerdir (Kıyıcı, 2006).

Yağ dokusu, yüksek yağ içeriğine sahip olduğu ve protein miktarı toplam doku kütlelerinin % 2' sinden daha az olduğu için beyaz yağ dokusu proteinlerinin izolasyonu ve analizi analitik olarak sıkıntılıdır. Bu çalışmada, retroperitoneal yağ dokusunda CAT aktivite tayininde kullanılabilir literatürlerde geçen üç farklı homojenizasyon yöntemi karşılaştırılıp, katalaz aktivitesi için en iyi spesifik aktiviteyi gösteren homojenizasyon yönteminin belirlenmesi ve ölçüm için gerekli şartların ortaya konulması amaçlandı.

## **1.2. Serbest Radikaller**

Oksidatif stres; vücutta ve dokulardaki oksidan antioksidan dengenin oksidanlar lehine bozulmasını tanımlamaktadır. Oksidanlar olarak bilinen reaktif oksijen türlerinin meydana gelişi normal aerobik yaşamın doğal bir sonucudur. Oksijen içeren ortamlardaki hücrelerin varlığı ve gelişimi güçlü antioksidan enzimler ve enzim dışı antioksidan sistemler olmaksızın mümkün değildir. Aerobik yaşamda, devamlı oluşan oksidanların antioksidanlar tarafından düzenli olarak tüketilerek dengelenmesi gerekmektedir (Sies,1991).

Serbest radikaller, dış orbitalinde en az bir tane eşleşmemiş elektron içeren, yüksek enerjili molekül veya atomlardır. Eşleşmemiş elektron barındırdıkları için rahatlıkla reaksiyona girebilirler. Eşleşmiş elektron çifti içeren moleküller serbest radikallere göre reaksiyona girme eğilimleri azdır. Bu yüzden kararlı yapıda bulunan, eşleşmiş elektron çifti içeren ve diğer maddeler ile radikallerden daha zor bir şekilde reaksiyona giren moleküller nonradikaller olarak tanımlanır. Serbest radikaller oksijen

ve nitrojen kaynaklı olabilir. Oksijen kaynaklı olanlar reaktif oksijen türleri ve nitrojen kaynaklı olanlar reaktif nitrojen türleri (RNS) olarak isimlendirilir (Lobo vd., 2010).

Reaktif oksijen türleri serbest radikallerin içinde yüksek aktivite gösterirler ve oksijen molekülü ihtiva ederler. ROS tipleri, hidroksil radikalini, süperoksit anyon radikalini, hidrojen peroksit, tekli oksijeni, hipoklorit radikalini ve çeşitli lipid peroksitlerini içerir. Hepsi membran lipidleri, nükleik asitler, proteinler ve enzimler ve diğer küçük moleküller ile reaksiyona girerek hücrel hasara yol açarlar (Krishnamurthy ve Wadhwani, 2011).

Bu reaktif türleri Tablo 1’ de gösterilmektedir.. (Karabulut ve Gülay, 2016).

**Tablo 1.** Oksijen ve nitrojen kaynaklı reaktif oksijen türleri

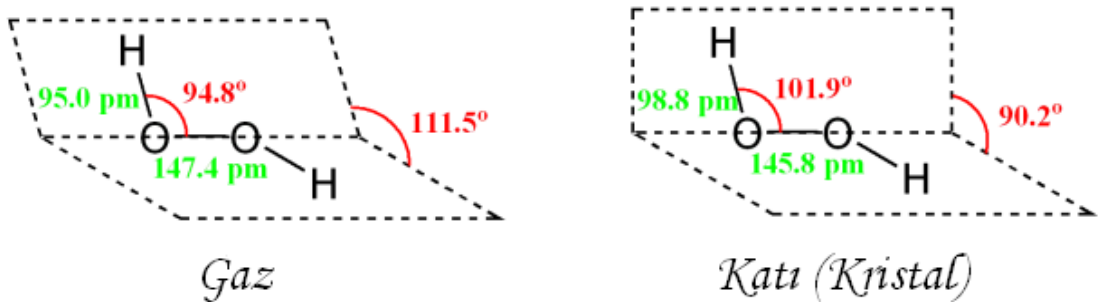
<b>Radikaller</b>		<b>Nonradikaller</b>	
Süper oksit	$O_2^{\cdot-}$	Hidrojen peroksit	$H_2O_2$
Hidroksil	$OH^{\cdot}$	Hipokloröz asit	$HOCl$
Peroksil	$ROO^{\cdot}$	Hipobromöz asit	$HOBr$
Alkoksil	$RO^{\cdot}$	Singlet oksijen	$^1O_2$
Hidroperoksil	$HO_2^{\cdot}$	Ozon	$O_3$
Lipid Peroksil	$LOO^{\cdot}$		
Nitrik oksit	$NO^{\cdot}$	Nitrik asit	$HNO_2$
Nitrojen dioksit	$NO_2^{\cdot}$	Nitrosil katyonu	$NO^+$
		Nitroksil anyonu	$NO^{\cdot-}$
		Dinitrojen tetroksid	$N_2O_4$
		Dinitrojen trioksit	$N_2O_3$
		Peroksi nitrit	$ONOO^{\cdot-}$
		Peroksi nitrik asit	$ONOOH$
		Nitronyum katyonu	$NO_2^+$
		Nitril klorid	$NO_2Cl$
		Alkil peroksinitrit	$ROONO$

### 1.3. Serbest Radikallerin zararları

Yüksek oranda reaktif olan serbest radikaller, hücresel membranlardaki çoklu doymamış yağ asitleri, DNA'daki nükleotitler ve proteinlerdeki sülfidril bağları ile reaksiyona girerek doku hasarına neden olabilir. Serbest radikaller endojen olarak normal metabolik reaksiyonlardan veya dış kaynaklı tütün dumanı ve hava kirleticilerin bileşenleri ile dolaylı bazı çözücülerin, ilaçların, pestisitlerin metabolizması ve radyasyona maruz kalması sonucu ortaya çıkabilir. Serbest radikal hasarının, amfizem, kardiyovasküler ve enflamatuvar hastalıklar, katarakt ve kanser gibi birçok kronik sağlık probleminin etiolojisine katkıda bulunduğu dair bazı kanıtlar vardır. Serbest radikal hasarına karşı savunmalar arasında tokoferol (E vitamini), askorbik asit (C vitamini), beta-karoten, glutatyon, ürik asit, bilirubin ve glutatyon peroksidaz (selenyum), katalaz (demir) ve süperoksit dismutaz (bakır) dahil olmak üzere çeşitli metaloenzimler bulunur. Doku hasarının kapsamı, üretilen serbest radikallerle antioksidan koruyucu savunma sistemi arasındaki dengenin bir sonucudur. Bazı diyet bileşenleri koruyucu sisteme büyük katkı sağlar (Machlin ve Bendich, 1987).

#### 1.3.1. Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ )

Hidrojen peroksitin üç boyutlu hali Şekil 1' de gösterilmiştir.



Şekil 1.  $H_2O_2$ 'nin üç boyutlu konfigürasyonu

Hidrojen peroksit, serbest radikal olmamak ile birlikte önemli bir oksidan kaynağıdır. Çünkü biyolojik membranlara etki edebilir. Nötrofiller de bulunan miyeloperoksidaz enzim tarafından hipokloröz asite (HOCl) dönüştürülür. Metallerinin

oksidasyonu yoluyla OH<sup>•</sup> radikali oluşur ve ROS moleküllerinin üretilmesine katkı sağlar. Hidrojen peroksit, O<sub>2</sub>' ye iki elektron ya da O<sub>2</sub><sup>•-</sup>' ye bir elektron eklenmesiyle oluşmaktadır (Karabulut ve Gülay, 2016).

İnsan vücudunda hidrojen peroksit, katalaz, glutatyon peroksidaz ve peroksiredoksinler olarak adlandırılan antioksidan enzim sistemleri tarafından suya dönüştürülerek ortadan kaldırılmaktadır (Karabulut ve Gülay, 2016).

#### **1.4. Antioksidan Sistemler**

Normal hücre metabolizmasının toksik yan ürünü olarak ve savunma amaçlı serbest radikaller oluşur. Bu serbest radikallerin insan vücudunda meydana getirebileceği oksidatif stresi yok etmek için antioksidanlar aktif olarak rol oynamaktadır. Antioksidanlar vücudumuza dışarıdan alınır veya doğal olarak vücudumuzda üretilirler. Tablo 2' de gösterilmektedir (Karabulut ve Gülay, 2016).



**Tablo 2.** Endojen ve eksojen içerikli antioksidanlar

<b>ENDOJEN ANTIÖKSİDANLAR</b>		
<b>ENZİMATİK ANTIÖKSİDANLAR</b>	<b>NONENZİMATİK ANTIÖKSİDANLAR</b>	
Süperoksit dismutaz (SOD)	Glutasyon	Koenzim Q 10
Katalaz (CAT)	Melatonin	Selenyum
Glutasyon peroksidaz (GP <sub>x</sub> )	Ürik asit	$\alpha$ – lipoik asit
Glutasyon redüktaz (GR)	Bilirubin	Transferrin
	Albümin	Seruloplazmin
<b>EKSOJEN ANTIÖKSİDANLAR</b>		
<b>VİTAMİN EKSOJEN ANTIÖKSİDANLAR</b>	<b>İLAÇ OLARAK KULLANILAN EKSOJEN ANTIÖKSİDANLAR</b>	
$\alpha$ – Tokoferol (Vitamin E)	Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopürinol, oksipürinol, pterin aldehit, tungsten)	
B-karoten (Vitamin A)	NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal anestezikler, kalsiyum kanal blokerleri, nonsteroidanti inflamatuvar ilaçlar)	
Askorbik Asit (Vitamin C)	Rekombinant süperoksit dismutaz	
Folik Asit (Vitamin B9)	Trolox-C (vitamin E analogu)	
	Endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar (GP <sub>x</sub> aktivitesini artıran ebselen ve asetilsistein)	
	Nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar (mannitol, albümin)	
	Demir redoks döngüsü inhibitörleri (desferroksamin)	
	Nötrofiladezyon inhibitörleri	
	Barbitüratlar	
	Demir şelatörleri	

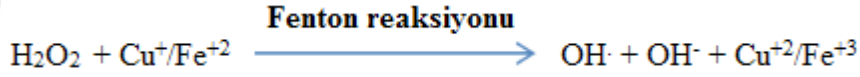
### 1.5. Katalaz

Katalaz (E.C. 1.11.1.6 ) (CAT) dört alt birimden meydana gelen antioksidan enzimidir. Her bir alt birim, NADPH molekülü ve hem grubu ihtiva eder. Katalazın aktif bölgesinde 4 adet Fe<sup>+3</sup> bulunur. Her alt kümesinin enzimi kendi substratı H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>' te karşı koruyan ve etkinliğini artıran NADPH ihtiva eder. Çoğu katalaz enzimin de NADPH molekülü yüzeye sıkıca bağlı ve yakındır (Dağdelen, 2015).

Katalaz enzimi hidrojen peroksitin, O<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub>O' ya dönüşümünü Şekil 2'de gösterildiği gibi katalizler. Hidrojen peroksit bir radikal kaynağı olduğu halde, biyolojik önemi olan moleküllerin çoğu ile reaksiyona girmez. Cu ve Fe iyonlarının katalizörlüğünde Fenton reaksiyonu ile en reaktif oksijen türü olan hidroksil radikali (OH·) oluşumunda bir ön madde olarak rol oynamaktadır. Fenton reaksiyonu Şekil 3'te gösterilmektedir (Karabulut ve Gülay, 2016)



Şekil 2. Katalaz reaksiyonu



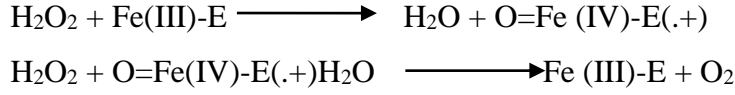
Şekil 3. Fenton reaksiyonu

### 1.5.1. Katalazın Tarihçesi

İlk olarak 1811 yılında *katalaz*, hidrojen peroksiti keşfeden Louis Jacques Thenard' ın, tarafından fark edildi. Oscar Loew bu maddeye 1900 yıllarında katalaz adını veren ilk kişi oldu. Birçok bitki ve hayvanda bulunduğunu gözlemledi. Sığırci karaciğerinde bulunan katalaz 1937 yılında, James B. Sumner ve Alexander Dounce adlı bilim insanları tarafından kristallendirildi ve moleküler ağırlığı 1938'de ortalama 240 kDa olarak tespit edildi. Sığırdan bulunan katalazın amino asit dizisi 1969' da belirlendi. Daha sonra 1981'de, proteinin üç boyutlu yapısı ortaya koyuldu (Sumner ve Dounce, 1937).

### 1.5.2. Katalitik Mekanizması

Katalaz reaksiyonunun tam mekanizması bilinmemekle birlikte, reaksiyonun iki aşamada gerçekleştiği düşünülmektedir. Bu mekanizma Şekil 4' te gösterilmektedir.

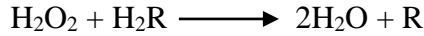


**Şekil 4.** Katalaz reaksiyonunun mekanizması

Burada Fe(IV)-E, enzime bağlı heme grubunun demir merkezini temsil eder. Fe(VI)-E(.+), Fe(V)-E' e tamamen oksitlenmez ancak heme ligandından bir miktar destekleyici elektron alır. Bu heme daha sonra radikal bir katyon olarak davranır (.+)(Boon vd., 2007).

Hidrojen peroksit aktif bölgeye girdikçe, Asn147 ve His74 amino asitleri ile etkileşir. Bu da o protonun (OH<sup>-</sup>) oksijen atomları arasında aktarılmasına neden olur. Yeni oluşan su molekülünü serbest bırakan serbest oksijen atomu koordinatları ve Fe(IV)=O, Fe(VI)=O ve Fe(III)-E' yi düzeltmek, su ve oksijen üretmek için ikinci bir hidrojen peroksit molekülü ile reaksiyona girer. Demir merkezinin reaktivitesi, Fe(III)' ün Fe(VI)' e oksidasyonuna yardımcı olabilecek beşinci demir ligandadır. Beşinci demir ligandının da Tyr357' nin fenolat ligandının varlığı ile sağlanabilir. Reaksiyonun verimliliği, His74 ve Asn147' nin reaksiyon ara ürünlerinin etkileşimleri ile sağlanabilir (Boon vd., 2007). Genel olarak, reaksiyon, Michaelis-Menten denklemi ile belirlenebilir (Maass, 1998).

Bu reaksiyonların kesin mekanizması bilinmemek ile birlikte net denklemi Şekil 5' te gösterilmektedir (Maass, 1998).



**Şekil 5.** Katalazın net reaksiyon denklemi

### 1.5.3. Hücresel görevi

Hidrojen peroksit, birçok normal metabolik sürecin zararlı bir ürünüdür. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vücudumuzda hücrelere ve dokulara zarar vermemesi için yararlı ürünlere dönüştürülmelidir. Bu amaçla katalaz sıklıkla hidrojen peroksitin daha az reaktif gaz halindeki oksijen ve su moleküllerine ayrışmasını ve hücre içine alınmasını sağlayan bir enzimdir (Gaetani vd., 1996).

Katalaz eksikliği, tip 2 diyabet gelişme olasılığını artırabilir. Bazı insanlar çok düşük seviyelerde katalaz enzimine sahiptir, ancak az sayıda yan etkisini görürler. Normal memelilerin hücrelerinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>' nin baskın temizleyicileri, katalazdan ziyade muhtemelen peroksiredoksinlerdir (Goth, 2008; Goth vd., 2001).

İnsan katalazı, insan vücudunun yaklaşık sıcaklığı olan 37°C' lik optimum bir sıcaklıkta çalışır. Buna karşılık, hipertermo philearchaea *Pyrobaculumcalidifontis*' ten izole edilen katalaz 90 °C' lik bir sıcaklık optimumuna sahiptir (Aebi, 1984; Amo vd., 2002).

Bitki hücrelerindeki peroksizomlar fotorespirasyona (oksijen ve karbon dioksit üretimi) ve simbiyotik azot fiksatine (reaktif nitrojen atomlarına diatomin nitrojenin “N<sub>2</sub> ayrılması”) dahil edilir. Hidrojen peroksit, hücrelere bir patojen ile enjekte edildiğinde güçlü bir antimikrobiyal madde olarak kullanılır. *Mycobacterium tuberculosis*, *Legionella pneumophila* ve *Campylobacter jejuni* gibi katalaz-pozitif patojenler, peroksit radikallerini deaktive ederler ve böylece zarar görmezler (Srinivasa vd., 2003).

#### **1.5.4. Dokular Arasındaki Dağılımı**

Enzim sitokrom sistemi içeren tüm oksijenli solunum yapan hücrelerde mevcuttur. CAT enziminin aktivitesi; karaciğer, böbrek, miyokard, çizgili kaslar ve eritrositlerde yüksektir. Fizyolojik şartlarda CAT, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonunu kontrol eder. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin hücrelerde birikimini engeller ve hücreleri oksidatif tehlikelere karşı korur (Kahraman, 2013).

Katalaz daha çok peroksizomlarda, glutatyon peroksidaz, sitozol ve mitokondride lokalize olarak birbirlerini tamamlayıcı bir yerleşim gösterirler. Böylece hücre içi hidrojen peroksit konsantrasyonu düzenlenmesini etkin bir şekilde yerine getirirler (Cheeseman ve Slater, 1993; Vendel, 1988).

### 1.5.5. Katalaz uygulamaları

Katalaz enzimi sadece hidrojen peroksiti katalizleyerek parçalanmasını sağlamakla (detoksifiye etmekle) kalmaz aynı zamanda da fenoller, formik asit, formaldehit ve alkoller içeren toksik etkili bileşikler okside etmede görev alır ve yine substrat olarak hidrojen peroksidi kullanır. Katalaz enzimi, ağartıcı, oksitleyici veya sterilizasyon amaçlı kullanılan hidrojen peroksidin uzaklaştırılmasında, hidrojen peroksit veya glukoz biyosensörlerin analitik amaçlı ölçümlerinde oldukça yaygın kullanılan bir enzimdir (Çimen vd., 2005).

### 1.6. Yağ Dokusu

Obezite, vücudun gereksiniminden fazla enerji içeren gıda alımı nedeniyle yağ dokusu oranında artış olması ve bunun sonucunda da vücut ağırlığının artması olarak tanımlanmaktadır (Dina, 2008). Son yıllarda özellikle yeme alışkanlığındaki değişikliklerle obezite ve obeziteye bağlı hastalıkların insidansında artış gözlenmektedir. Obezitenin en karakteristik özelliği yağ dokusunun artmasıdır. Yağ dokusu adiposit olarak adlandırılan lipid dolu hücrelerin gevşek olarak bağlanmasıyla oluşur. Ayrıca yağ dokusu fibroblast, lökosit ve makrofaj gibi bazı yapısal hücreler de içerebilir (Gimble, 2003). Yağ dokusunun enerji depolama, yağda eriyen vitaminleri depolama, fiziksel koruma gibi fonksiyonları vardır. Son yıllarda bu fonksiyonlarına ek olarak adipositlerden ve adipositler arasında bulunan bağ dokusu hücrelerinden salgılanan adipokin ismi verilen bazı proteinlerin otokrin, parakrin ve endokrin etkileri olduğu gösterilmiştir (Gimble, 2003; Tilg ve Hotamışlıgil, 2006).

Yağ dokusu, diyetle alınan fazla enerjiyi triaçilgliserol (TG) şeklinde depolamasında ve enerji metabolizmasının kontrolünde rol almaktadır. Yağ dokusu leptin, rezistin, adiponektin, retinol bağlayıcı protein 4 (RBP-4), tümör nekrozis faktör- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interlökin-6 (IL-6) gibi molekülleri de salgılamaktadır. Bu moleküller hipertansiyon, insülin direnci ve kanser gibi hastalıkların patolojisinde etkin rol almaktadır. Yapılan çalışmalar yağ dokularının vücudun farklı yerlerinde çeşitli fonksiyonlara ve sentez özelliklerine sahip olduğunu göstermektedir. Yağ hücrelerinde artan lipid içeriği adipositin işlevinin bozulmasına sebep olmakta ve salgılanan adipokin

profilini değiştirmektedir. Son zamanlardaki çalışmalarda, obezite ile birlikte yağ dokusunda artmış bir oksidatif stresin varlığı belirtilmiştir. (Kahraman, 2013).

### 1.6.1. Yağ Dokusu, Oksidatif Stres ve İnflamasyon

Obezite vücutumuzda alınan fazla enerji sonucu yaę kitlesinin artışı olarak bilinmektedir. Özellikle artan yaę kitlesi ile tip 2 diyabet, metabolik sendrom, hipertansiyon ve astım gibi pek çok hastalığın ortaya çıkması bu durumu ispatlamaktadır. Yaę dokusunun, salgıladığı adipokinlerin miktarındaki değişiklikler sonucunda bu hastalıkların patogenezinde rol oynadığı dūřünölmektedir (Metha ve Farmer, 2007). Ayrıca adipositlerin obezite gibi stres durumlarında çeşitli inflamatuvar mediatörleri salgıladığı tesbit edilmiştir (Furuhashi vd., 2008). C-reaktif protein, IL-6, TNF-Alfa ve sellöler adezyon molekülleri gibi plazmadaki inflamatuvar göstergeler obez kişilerde değişmez bir şekilde yükselmekte ve adipozite ve insölin direnci parametreleri ile korelasyon göstermektedir (Tilg ve Hotamışligil, 2006; Furuhashi vd., 2008). Fare modellerinde, yaę rezervlerindeki makrofaj infiltrasyonu ve artmış immöün aktivite, sistemik insölin direnci ile ilişkilendirilmiştir Bu hayvan çalışmaları adipositlerle immöün hücre popöasyonu arasındaki yerel sitokin etkileşiminin obeziteyle ilişkili kronik inflamatuvar durumun sürdürölmesi ve şiddetlendirilmesinde merkezi bir rol oynadığı dūřünölmektedir (Furuhashi vd., 2008).

Obezite gittikçe artan insidansı ile önemli bir sağlık problemi olarak ortaya çıkmaktadır. Obezitenin biyokimyasal mekanizmalarını anlamak ve uygun tedavi protokolleri oluşturabilmek için *in vivo* ve *in vitro* modellerde birçok çalışma yapılmaktadır. Elde edilen bulgular obezitede oksidatif strese katkıda bulunan çeşitli muhtemel mekanizmaları ortaya koymuştur. Bunlar hiperglisemi, vücut ağırlığını taşımak için artan kas aktivitesi, artan oksijen tüketimi, yüksek doku lipit seviyeleri, yetersiz antioksidan savunma, kronik inflamasyon, hiperleptinemiye bağlı endotelial ROS üretiminin artmasıdır (Kahraman, 2013).

## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

### 2.1. Kullanılan Cihazlar, Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Ticari Kitler

Bu çalışmada kullanılan cihazlar, laboratuvar aletleri ve kimyasal malzemeleri üretici firmaları ile beraber Tablo 3' te gösterilmiştir.

**Tablo 3.** Kullanılan cihazlar ve malzemelerin listesi

<b>Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler</b>	<b>Üretici Firma</b>
Vorteks	Velp. Scientificavortex
Magnetik karıştırıcı	Wise stir MSH-20D
Otomatik pipet 10-100 µL	Brandtransferpette
Otomatik pipet 100-1000 µL	Brandtransferpette
Otomatik pipet 1-5 mL	Gilsonpipetman
pH metre	Hanna instruments HI 2210 pH Meter
Homojenizatör	Omni international tissuemaster 125
Hassas analitik terazi	Acculabsartorius group
Deney tüpleri	Isotherm test tube
Soğutmalı santrifüj	Thermo Scientific Multifuge3SR+
Çalkalayıcı	HLC Biotech
Tris-baz	Himedia
Tris-HCl	Merck
EDTA	Himedia
NaCl	Merck
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck
Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	Himedia
Kloroform	Merck
Metanol	Merck
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Sigma Aldich
HCl	Merck
HEPES	Ambresco
Triton X-100	Merck

## 2.2. Kullanılan Hayvanlar

Retroperitoneal yağ dokusu elde etmek için Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezi' nde farklı çalışmalar için sakrifiye edilmiş erkek Spragua Dawley ırkı ratın retroperitoneal yağ dokusu alındı.

## 2.3. Beyaz Yağ Dokusu Homojenizasyon Yöntemi Seçimi

Retroperitoneal yağ dokusu alınarak literatürde de geçen CAT' ın spesifik aktivitesinin en yüksek olduğu homojenizasyon yöntemini belirlemek için üç farklı lipit homojenizasyon yöntemi uygulanmıştır.

### 2.3.1. Homojenizasyon Yöntemi 1

#### *İzolasyon Tamponu Hazırlanması (0,05 M pH 7,4)*

0.606 g Tris, 0.87 g NaCl ve 0.08 g EDTA tartılarak yaklaşık 50 mL saf suda magnetik karıştırıcı ile çözünmesi sağlandı. Ardından pH 7,4' e ayarlandı. Daha sonra balon jöjeye aktarılarak hacmi 100 mL' ye tamamlandı.

Yaklaşık 100 mg yağ dokusu cam tüplere alındı. 200 µL izolasyon tamponu ve 750 µL kloroform/metanol karışımı (2:1) ilave edilerek homojenize edildi. Homojenatlar ependorflara aktarılarak 20 dk buzda bekletildikten sonra 250 µL kloroform ve 250 µL saf su eklendi ve ependorflar vortekslendi. +4°C 15000 rpm' de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında iki faz gözlemlendi. Üstteki süpernatant temiz ependorfa aktarılarak CAT ölçümü için hazır hale getirildi (Sajic vd., 2011).



### 2.3.2. Homojenizasyon Yöntemi 2

#### *HEPES Tamponunun Hazırlanması (25 mM pH 8,80)*

1.63 g HEPES tartılarak yaklaşık 150 mL saf suda magnetik karıştırıcı ile çözünmesi sağlandı. Ardından pH 8,80' e ayarlandı. Daha sonra balon jöjeye aktarılarak hacmi 250 mL' ye tamamlandı.

Bir önceki homojenizasyon yöntemi modifiye edilerek işlem gerçekleştirildi. Yaklaşık 100 mg yağ dokusu cam tüplere alındı. 200 µL 25 mM HEPES tamponu çözeltisi içinde homojenize edildi. Homojenatlar ependorflara aktarıldı ve 200 µL kloroform ilave edilerek +4°C de 15000 rpm' de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj ardından iki faz gözlemlendi. Üstteki süpernatant fazı temiz ependorfa aktararak CAT ölçümü için hazır hale getirildi (Selvi, 2018).

### 2.3.3. Homojenizasyon Yöntemi 3

#### *Homojenizasyon Tamponu (0,05 M pH 7,4 )*

Bir balon jöjenin içine sıvı triton X-100 50 µL ilave edildi ve üzerine 100 mL saf su ilave edilerek çözelti hazırlandı. 0,05 M 100 mL Tris-HCl hazırlamak için bu maddeden 0,788 gr tartıldı ve bir miktar saf su da çözünmesi sağlandıktan sonra 100 mL' ye tamamlandı. Hazırlanan iki çözelti birbirine karıştırıldıktan sonra pH 7,4' e ayarlanarak homojenizasyon tamponu hazırlandı.

150 mg yağ dokusu tartılarak buz içine alındı. Buz üzerinde bekleyen dokunun üstüne 2 mL soğuk homojenizasyon tamponu ilave edildi. Dokular soğuk ortamda 10 saniye boyunca homojenizatörle homojenize edildi. Homojenize doku +4 °C' de, 3000 rpm' de, 10 dakika santrifüj edildi. En üstteki yağ tabakası bir pastör pipet yardımıyla uzaklaştırılarak süpernatant alındı. 1 mL süpernatant üzerine 300 µL kloroform konuldu. Karışım vortekslenerek +4 °C' de, 10.000 g' de 15 dk santrifüj yapıldı. Elde edilen süpernatant CAT ölçümü için hazır hale getirildi (Furukawa vd., 2004; Kahraman, 2013).

## 2.4. Katalaz Aktivite Tayininde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

### 50 mM Fosfat Tamponu (pH 7,00)

3,405 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ve 4,45 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 500 mL saf suda çözüldüler. Bu çözeltiler sırasıyla 1:1,5 oranında karıştırıldı ve pH 7,00' ye ayarlandı.

### %30' luk Hidrojen Peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )

0,17 mL %30' luk  $\text{H}_2\text{O}_2$  alınarak fosfat tamponu ile 50 mL' ye tamamlandı. Her ölçüm için yenisi hazırlandı.

## 2.5. Deneyin Yapılışı

Doku homojenatları Tablo 4' te belirtildiği gibi pipetleme yapıldı.

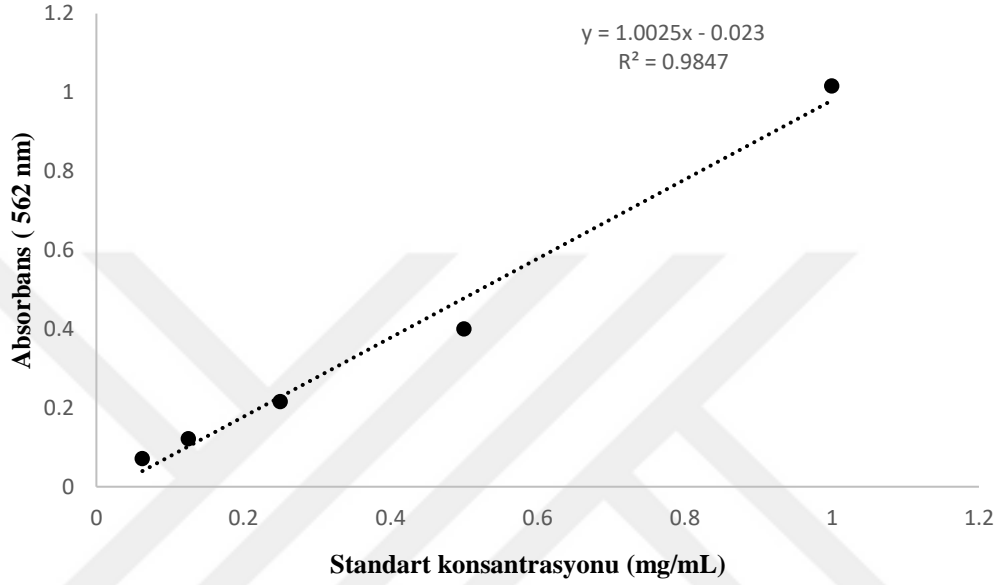
**Tablo 4.** Katalaz aktivitesi ölçümü için reaksiyon karışımı

Reaktifler	Kör (mL)	Numune (mL)
Fosfat tamponu	0,25	-
Numune	0,50	0,50
$\text{H}_2\text{O}_2$	-	0,25

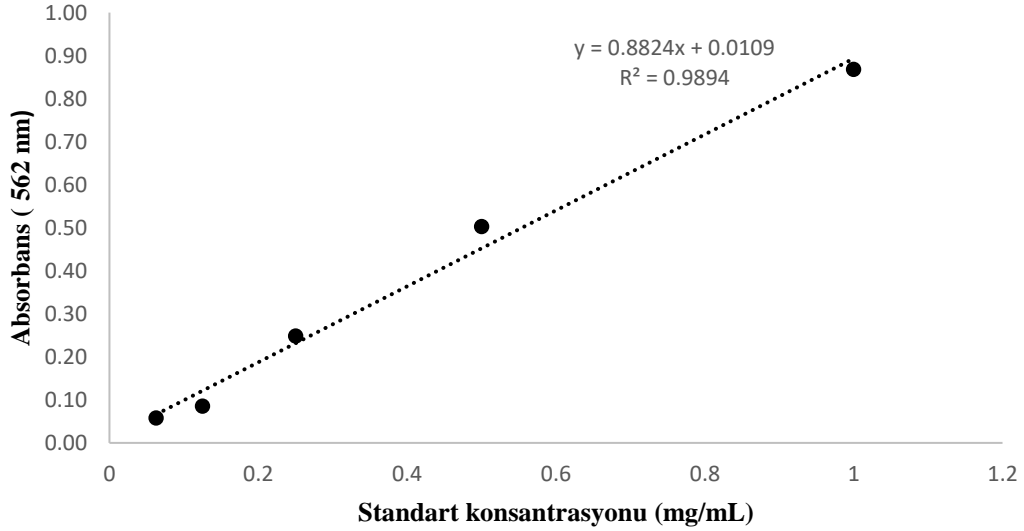
### 2.5.1. Protein Miktar Tayini

Retroperitoneal yağ dokularından elde edilen homojenatlar da protein tayini için bisinkonik asit (BCA) protein ölçüm kiti kullanılmıştır. BCA kiti protokolüne uygun şekilde hazırlanmıştır. Burada kit prosedürü Biüretin tepkimeye girmesiyle başlar.  $\text{Cu}^{+2}$ , alkali çözeltide bulunan protein tarafından  $\text{Cu}^{+1}$ 'e indirgenir ve BCA, indirgenmiş Cu ile kenetlenerek mor bir reaksiyon kompleksi oluşturur. Oluşan bu mor kompleks 562 nm' de ölçümü ile beraber protein miktarı belirlenmektedir.

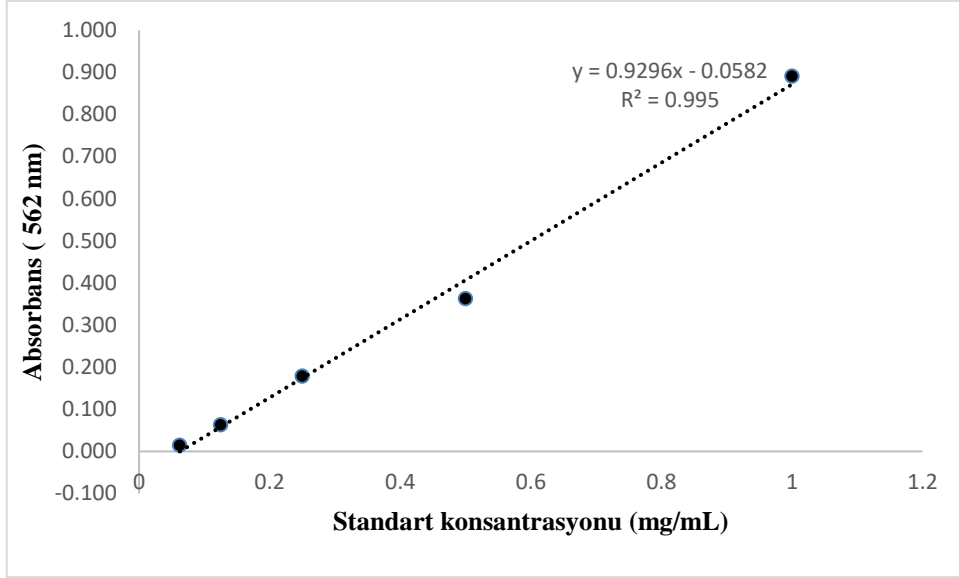
Çalışmada stok standart olarak 2 mg/mL' lik sığır bovine serum albümini (BSA) kullanıldı. Retroperitoneal yağ dokularından elde edilen protein fazların konsantrasyonları sırasıyla Şekil 6, 7 ve 8' de ki standart grafiklerine göre mg/mL cinsinden hesaplandı.



Şekil 6. Homojenizasyon yöntemi 1 (H1) protein standart grafiği



Şekil 7. Homojenizasyon yöntemi 2 (H2) protein standart grafiği



Şekil 8. Homojenizasyon yöntemi 3 (H3) protein standart grafiği

## 2.6. İstatiksel Analiz

Elde edilen sonuçlar ortalama olarak ifade edildi. Karşılaştırmalar Kruskal Wallis testi ile yapıldı ve post hoc olarak ta Mann Whitney U testi kullanıldı.  $p < 0,05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

### 3. BULGULAR

Homojenizasyon yöntemlerinde ölçülen CAT aktivitelerini spesifik aktiviteye çevirmek için kullanılan protein miktarları farklı dilüsyonlar için Tablo 5’ te verilmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirmeler sonucunda H3’ ün H1’ e göre daha yüksek protein içeriğine sahip olduğu gözlemlendi ( $p=0,010$ ). H2 ile H3 arasında farklılık tespit edildi ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bulunamamıştır ( $p=0,234$ ). Aynı şekilde H1 ile H2 arasında da protein içerikleri yönünden herhangi bir fark bulunmadı ( $p=0,505$ ).

**Tablo 5.** Kullanılan 3 yöntemde elde edilen protein miktarı sonuçları (mg/mL)

Seyreltme oranı	H1	H2	H3
Dilüsyonsuz	0,274	0,646	0,994
1/2	0,176	0,242	0,522
1/4	0,122	0,117	0,354
1/10	0,083	0,044	0,177

#### 3.1. Retroperitoneal Yağ Dokusunda Katalaz Ölçüm Sonuçları

Çalışmamızda 1. Homojenizasyon yönteminde CAT enzim aktivitelerinin ortalama sonuçları Tablo 6’da verilmiştir.

**Tablo 6.** 1. Homojenizasyon (H1) yöntemine göre spesifik aktivite sonuçları (k/mg protein)

Seyreltme oranı	1. ölçüm	2. ölçüm	Ortalama
Dilüsyonsuz	$6,65 \cdot 10^{-3}$	$4,87 \cdot 10^{-3}$	$5,76 \cdot 10^{-3}$
1/2	$6,96 \cdot 10^{-3}$	$9,81 \cdot 10^{-3}$	$8,38 \cdot 10^{-3}$
1/4	$20,27 \cdot 10^{-3}$	$26,94 \cdot 10^{-3}$	$23,60 \cdot 10^{-3}$
1/10	$5,31 \cdot 10^{-3}$	$5,55 \cdot 10^{-3}$	$5,43 \cdot 10^{-3}$

Çalışmamızda 2.Homojenizasyon yönteminden elde edilen spesifik aktiviteler ve ortalaması Tablo 7' de verilmiştir.

**Tablo 7.** 2. Homojenizasyon (H2) yöntemine göre spesifik aktivite sonuçları (k/mg protein)

<b>Seyreltme oranı</b>	<b>1.ölçüm</b>	<b>2.ölçüm</b>	<b>3.ölçüm</b>	<b>Ort</b>
<b>Dilüsyonsuz</b>	$2,02*10^{-3}$	$2,60*10^{-4}$	$1,66*10^{-3}$	<b><math>1,31*10^{-3}</math></b>
<b>1/2</b>	$14,90*10^{-3}$	$5,83*10^{-4}$		<b><math>7,74*10^{-3}</math></b>
<b>1/4</b>	$5,74*10^{-3}$	$3,19*10^{-3}$	$13,18*10^{-3}$	<b><math>7,37*10^{-3}</math></b>
<b>1/10</b>	$9,33*10^{-3}$	$9,22*10^{-3}$		<b><math>9,28*10^{-3}</math></b>

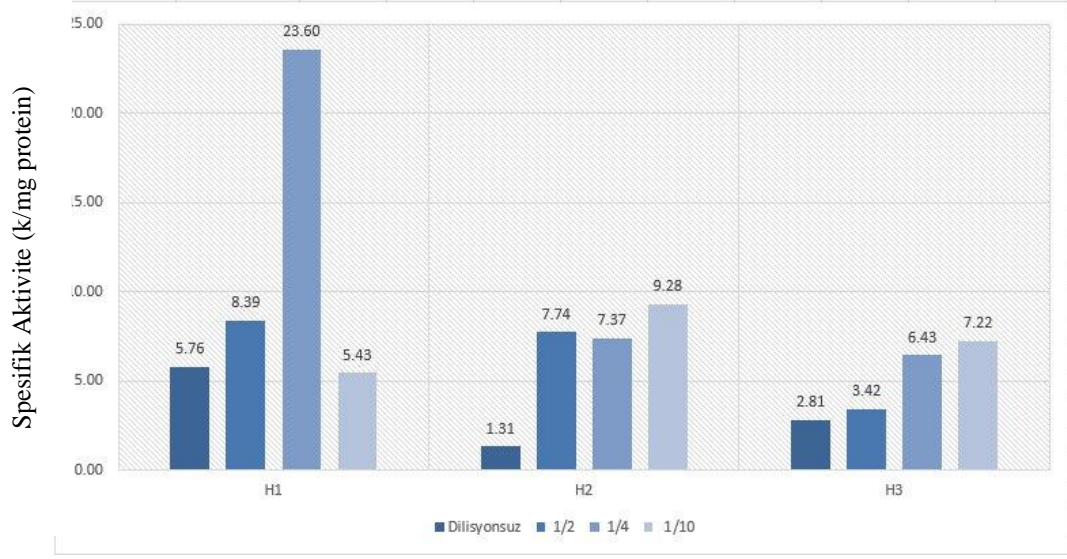
Çalışmamızda 3.Homojenizasyon yönteminden elde edilen spesifik aktiviteler ve ortalaması Tablo 8' de verilmiştir.

**Tablo 8.** 3. Homojenizasyon (H3) yöntemine göre spesifik aktivite sonuçları (k/mg protein)

<b>Seyreltme oranı</b>	<b>1.ölçüm</b>	<b>2.ölçüm</b>	<b>Ort</b>
<b>Dilüsyonsuz</b>	$2,948*10^{-4}$	$2,68*10^{-3}$	<b><math>2,81*10^{-3}</math></b>
<b>1/2</b>	$5,099*10^{-3}$	$1,75*10^{-3}$	<b><math>3,42*10^{-3}</math></b>
<b>1/4</b>	$11,11*10^{-3}$	$1,741*10^{-3}$	<b><math>6,43*10^{-3}</math></b>
<b>1/10</b>	$3,212*10^{-3}$	$11,22*10^{-3}$	<b><math>7,22*10^{-3}</math></b>

### 3.2. Yöntemlere göre spesifik aktivite sonuçları (k/mg protein)

Her üç homojenizasyon yönteminin de farklı dilüsyonlardaki spesifik aktiviteleri Şekil 9' da gösterilmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirmeler sonucunda üç yöntem arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ( $p=0,886$ ).



**Şekil 9.** Üç homojenizasyon yönteminin spesifik aktiviteleri

#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Yağ dokusu vücutta enerjinin depolandığı ana doku olmasının yanı sıra, endokrin bir organ olarak, birçok fizyolojik ve patolojik olayda rol alan adipokinleri de salgılamaktadır (Jung ve Choi, 2014; Demirci ve Gün, 2017). Salgılanan adipokinler obezite, metabolik sendrom, tip 2 diyabet, hipertansiyon ve kanser gibi birçok hastalığın patolojisinde önemli rol oynamaktadır. (Darroudi vd., 2019)). Bahsedilen hastalıkların moleküler ve biyokimyasal mekanizmalarının ortaya çıkarılmasında yağ dokusunda bulunan protein karakterli moleküllerin izolasyonu ve ölçümleri oldukça önemli ve bilgi vericidir.

Vücutta veya bir dokuda oksidan- antioksidan dengesinin oksidanlar lehine kayması ile oksidatif stres oluşur. Oldukça farklı karakterde oksidan bileşik bulunmasına rağmen, organizmada, oksidatif stresten genellikle reaktif oksijen türleri sorumludur. Reaktif oksijen türleri aerobik hücresel metabolik süreçlerde sürekli olarak üretilir. Süperoksit ve hidrojen peroksit gibi serbest radikaller lipidler, proteinler ve DNA gibi çeşitli hücre içi moleküllerle reaksiyona girer. Aerobik metabolizma sırasında ROT üretilmesine rağmen, ROT' un biyolojik hedefleri üzerine olan etkileri aktif konsantrasyonlarına bağlıdır ve oksidatif stres durumunda bu türlerin seviyeleri normale göre çok daha yüksektir. ROT' lerin yüksek seviyelerinin toksik olmasına rağmen, düşük seviyeleri hücre farklılaşması, apoptoz, hücre çoğalması ve redoks duyarlı sinyal iletim yolları gibi bazı önemli fizyolojik mekanizmaların düzenlenmesi önemlidir. (Süleyman vd., 2018; Savini vd., 2013). Obezite, tip 2 diyabet, kalp-damar hastalıkları ve kanser gibi hastalıklarda artmış oksidatif stres patolojide önemli rol oynar. Özellikle obezitede hipertrofi ve hiperplaziye bağlı olarak büyüyen yağ dokusu, adiposit disfonksiyonuna bağlı olarak, normal adipokin profilinin dışına çıkarak inflamatuvar süreci tetikleyen bir adipokin salgı profili kazanır (yüksek leptin, TNF- $\alpha$ , IL-6 ve düşük adiponektin salgısı gibi). Özellikle bu dokudan salgılanan inflamatuvar sitokinlerin artışı bölgede bulunan makrofaj ve monositlerden reaktif oksijen ve azot türlerinin sentezinin artmasına yol açar. Ayrıca, artan mitokondriyal oksidasyon ve mekanik yükte yağ dokusunda oksidatif stresi daha da derinleştirir. Yukarıda bahsedilen etkiler sonucu obezite düşük seviyeli kronik inflamatuvar bir süreç olarak tanımlanır (Ferrandez vd., 2011; Ipar, 2012; Darroudi vd., 2019).



Oksidatif stres aynı zamanda yetersiz antioksidan savunma mekanizmaları ile de ilgilidir. ROT hücre içi konsantrasyonu, bu bileşiklerin üretimi ve bunların antioksidanlarca ortamdaki uzaklaştırılma hızlarına bağlıdır. Hücreler oksidatif stresin neden olacağı hasarı engellemek ya da tamir etmek için birçok antioksidan mekanizmaya sahiptir. Özellikle antioksidan enzimlerden, SOD, CAT ve GPx oksijen kullanan tüm hücrelerin canlılığı için gereklidir. Bu enzimlerin sıralı reaksiyonları sonucu süperoksit radikali suya indirgenmektedir (Christine vd., 2010). Obeziteye bağlı oksidatif stresin değerlendirilmesinde de yağ dokusunda bu enzimlerin ölçümü yapılmaktadır (Sajic vd., 2011). Ayrıca obezite fizyopatolojisi ile ilgili moleküler çalışmalarda ve tedaviye yönelik uygulamaların değerlendirilmesi için kullanılan, proteomik, ELISA, western blot ve enzim ölçümleri gibi yöntemler için yağ dokusundan protein izolasyonu gerekmektedir. Ancak, yüksek lipid içeriği ve protein miktarının bu dokuda çok düşük seviyede olması (% 2 civarında), yağ dokusundan analitik amaçlı protein izolasyonu ve ölçümünü güçleştirmektedir. Yağ hücreleri yapısal olarak sitoplazmalarında triaçilgliserol ve az miktarda kolesterol ve fosfolipid içeren lipid damlacıklarını içerir. Sitoplazmada ki lipid damlacıkları perilipin denilen bir proteince sarılmıştır. Bu hidrofobik proteinlerin klasik deterjan kullanan yöntemlerle izolasyonu zordur. Proteinler oluşan misel yapılarının içinde kalmakta ve izole edilen protein miktarı azalmaktadır. Ayrıca, deterjanların birçok ölçüm için interferans yapmaktadır (Sajic vd., 2011).

Bu tez çalışmasında, yağ dokusu örneklerinde CAT enzim aktivitesi ölçümünde kullanılacak organik solventle doku homojenizasyonunun delipidasyonu (lipidlerin uzaklaştırılması) esasına dayanan üç farklı yöntem karşılaştırılmıştır. Yöntemlerin etkinliği ortaya koymak için spesifik aktivite değerleri hesaplanmış ve değerlendirilmiştir. Kullanılan ilk homojenizasyon yönteminde (H1) yağ dokusu Sajic ve ark. tarafından tanımlanan yöntem modifiye edilerek homojenize edilmiştir. İzolasyon tamponu ile yapılan homojenizasyonu takiben kloroform/metanol (1:2) karışımı ile delipidasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. İkinci homojenizasyon yönteminde (H2) HEPES tamponu ile yapılan homojenizasyonu takiben kloroform ile delipidasyon işlemi yapılmıştır. Üçüncü homojenizasyon yönteminde (H3) yağ dokusu homojenizasyonu yine homojenizasyon ve deterjan (triton X-100) ile yapılmıştır,

delipidasyon işlemi sadece kloroform kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar (Tablo 5) incelendiğinde en yüksek protein değerlerinin H3' de olduğu gözükmektedir. H3' de en yüksek protein içeriğinin olmasında polar organik çözeltiler kullanılmamasının bir sonucu olabilir. Proteinler organik çözücülerle muamele edildiklerinde çökerler. Bununla beraber, bazı hidrofobik proteinler, özellikle hücre zarlarında yerleşenler organik çözücüler etkisi ile çöktürülemezler. Hücre zarlarında kullanılan organik çözücüler proteinin hidrofobik parçaları etrafındaki su moleküllerinin yerini alırlar. Buda, protein çözünürlüğünün artması ile sonuçlanır. Ayrıca bu homojenizasyon yönteminde kullanılan deterjanda protein çözünürlüğünü arttırmış olabilir. Proteinlerin molekül büyüklüğüne bağlı olarak ta çökme davranışını değiştirmektedir. Büyük molekül ağırlıklı proteinler diğer özellikleri aynı olan daha küçük molekül ağırlıklı proteinlere göre daha düşük organik çözücü konsantrasyonların da çökerler (Asakura vd., 1978). Homojenizasyon yöntemleri içerisinde tampon/kloroform oranı en yüksek homojenizasyon yöntemi H3' dür. Bu sebebe bağlı olarak H3' de ölçülen protein miktarı daha yüksek olabilir.

CAT hücrelerde SOD tarafından üretilen hidrojen peroksiti su ve oksijene dönüştüren enzimdir. CAT'ın çoğunluğu peroksizomlarda lokalize olmuştur. İnflamatuar bir süreç olan obezitede dokuda gözlenen oksidatif stresin ana kaynağının NADPH oksidazdır. Bu enzim bol miktarda süperoksit anyonu oluşturmaktadır. Süperoksidin zararlı etkilerinin bertaraf edilmesinde ilk savunma hattı SOD aktivitesidir. Bu aktiviteye bağlı oluşan hidrojenperoksitte CAT ve glutatyon peroksidaz aktiviteleri ile bertaraf edilir (Christine vd., 2010).

Farklı seyreltme oranlarında üç homojenizasyon yöntemi ile elde edilen spesifik aktivite değerleri tablo 6, 7, 8 ve Şekil 9'da verilmiştir. En yüksek spesifik aktivite değeri H1' de elde edilmiştir, ancak istatistiksel olarak bu fark anlamlı bulunmamıştır ( $p=0,886$ ). H1 yöntemi en düşük ortalama protein değerlerine sahip olmasına rağmen en yüksek CAT aktivitesine sahiptir. Her üç homojenizasyon yönteminde de yukarıda anlatıldığı gibi apolar bir organik çözücü (kloroform) ve H1 de polar organik çözücü (metanol) kullanılmıştır. Genel olarak kullanılan organik çözücüler izole edilecek proteinlerin üç boyutlu yapılarını değiştirerek çözünürlüklerinin kaybetmelerine ve çökmelerine sebep olur. Bahsedilen etki 0 °C üzerindeki şartlarda daha belirgindir. Bu

yüzden denatürasyon çalışmalarında, proteinleri çöktürmek için organik çözücüler sıklıkla kullanılır. Organik çözücüler biyolojik örneklerde tüm proteinlerin çökmesini sağlayabileceği gibi, uygun deneysel şartlarda bazı protein fraksiyonlarının çökmeden fonksiyonel olarak ortamda kalmasını sağlayabilir. Bu yöntem enzim izolasyon çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır (Englard ve Seifter, 1990).

Enzim katalizi ile ilgili çalışmalarında, substrat (lar) organik çözücülerde daha fazla çözünürlüğe sahip olduğu, arzulanan yönlerde reaksiyon dengelerinin değiştirilmesi, kontaminasyon riskinin azaltılması, termostabilitenin artırılması, enzimin geri kazanımı ve tekrar kullanılabilirliği, uçucu çözücüler kullanıldığında enerji verimliliğinin artırılması, asit anhidritler gibi "neme duyarlı" substratlar/reaktifler kullanması gerektiğinde, substratın özgülüğü, özgünlüğüne ve enantioselektiflik gibi durumlarda organik çözücü kullanımı tercih edilir (Gupta, 1992). Kullanılan organik çözücü, enzimlerin tersiyer ve kuaterner yapılarını etkileyerek ölçümler sırasında domainlerin esnekliğini, substratların aktif bölgeye ulaşması ve bağlanması gibi özellikleri değiştirerek enzim aktivitesi üzerine olan etkisi gerçekleştirebilir (Wiggers vd., 2007). Polar organik çözücülerden metanol ve etanol gibi alkollerin GAPDH, fruktoz 1, 6-bisfosfataz ve alkalin fosfataz gibi enzimlerin aktivitesini önemli ölçüde arttırdığı gösterilmiştir (Wiggers vd., 2007; Krishnoswamy ve Kenkare, 1970). Bu olayın kesin nedeni bilinmemekle birlikte, alkollerin peptitlerde ve proteinlerde yapısal değişiklikler meydana getirdiği uzun zamandır bilinmektedir. Alkoller enzimlerin konformasyonel esnekliğini artırarak katalitik aktivite için moleküler bir kayganlaştırıcı gibi davranmaktadır (Wiggers vd., 2007).

H1' de yağ dokusu homojenize edildikten sonra kullanılan kloroform/metanol karışımı H2' de kullanılan kloroforma göre CAT aktivitesini daha iyi korumuştur. Bunda mevcut aktivitenin korunması kadar metanolün CAT aktivitesini yukarıda bahsedilen şekilde artırmış olmasının bir sonucu olabilir. H1' ve H2' de hemen hemen aynı miktarda protein içeriği bulunması rağmen CAT aktivitesinin H2' de daha düşük olmasında, proteinin denatürasyonla aktivitesini kaybetmesi, en azından kullanılan kloroform miktarının CAT fraksiyonunu çözünür halde tutamamasının da sonucu olabilir. Ayrıca, organik çözücüler su ile karıştırıldığında ısı üretimine sebep olmaktadır ve bu denatürasyonu daha da artırmaktadır (Englard ve Seifter, 1990). H1' de buz

üzerinde numuneler bekletilirken H2' de bu uygulama yapılmamıştır. H2 için soğuk ortamın sağlanmamış olması denatürasyonu artırmış olabilir. Yukarıda bahsedildiği gibi organik çözücüler substratların çözünürlüğü üzerinde de etkilidir. Metanolün kloroforma göre daha polar olması deneylerde kullanılan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>' nin çözünürlüğü üzerinden de enzim aktivitesinin H1' de daha yüksek olmasına sebep olmuş olabilir. Elde ettiğimiz sonuçlar Aebi yöntemi ile CAT aktivitesi ölçümü ile ilgilidir. CAT aktivitesi ölçümünde kullanılacak farklı yöntemlerde (Goth yöntemi gibi) substrat değişikliği gibi faktörler farklı sonuçların elde edilmesine sebep olabilir. H3' de en yüksek protein miktarına rağmen en düşük CAT aktivitesi ölçülmesinde deterjan kullanılmaması etkili olabilir. Triton X-100' ün deterjan etkisi lipid-protein ayrımını tam anlamıyla yerine getirirken, yüksek miktarda ürün elde edilmesine imkan sağlarken, apolar karakterinden dolayı proteinlerde ciddi denatürasyona yol açmış olabilir. Yine yüksek apolariteden dolayı substrat çözünürlüğünün azalması, elektron transferinin zorlaşması gibi olaylar CAT' ın aktivite kaybına uğramasına sebep olmuş olabilir. Ayrıca H2 yöntemindeki kullanılan pH' nın 8,8 değerine sahip olması da katalaz aktivitesini değiştirmiş ve daha düşük spesifik aktiviteye sebep olmuş olabilir.

Sonuç olarak, retroperitoneal yağ dokusunda Aebi yöntemi ile CAT aktivite tayininde kullanılacak üç farklı homojenizasyon yöntemi karşılaştırıldığı çalışmamızda, H1 yönteminin CAT aktivitesi tayininde daha yüksek spesifik aktiviteye sahip olduğu gözlemlendi ve bu etkide daha polar özelliğe sahip metanol varlığının ve soğuk ortam uygulamasının önemli olabileceği kanaatine varıldı.

## KAYNAKLAR

- Aebi, H., 1984.** Aebi, Hugo. ed. "Catalase in vitro". *Meth. Enzymol.*. Methods in Enzymology 105: 121–126. doi:10.1016/S0076-6879(84)05016-3. ISBN 0-12-182005-X. PMID 6727660.
- Amo, T., Atomi, H., Imanaka, T., 2002.** Unique presence of a manganese catalase in a hyperthermophilic archaeon, *Pyrobaculum caldifontis* VA1. *J. Bacteriol.* **184** (12): 3305–3312. doi:10.1128/JB.184.12.3305-3312.2002. PMC 135111. PMID 12029047.
- Asakura, T., Adachi, K., Schwartz, E., 1978.** Stabilizing Effect Of Various Organic Solvents On Protein. *J Biol Chem*253(18): 6423-6425.
- Boon, E.M., Downs, A., Marcey D., 2007.** Proposed Mechanism of Catalase. Proposed Mechanism of Catalase. Catalase: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Oxidoreductase: Catalase Structural Tutorial.
- Cheeseman, K.H., Slater, T.F., 1993.** An Introduction to Free Radical Biochemistry. *Brit MedBull.* 49(3), 481 -493.
- Christine J. Weydertand Joseph J. Cullen, 2010** Measurement Of Superoxide Dismutase, Catalase, and Glutathione Peroxidase in Cultured Cells and Tissue, *Nat Protoc.*; 5(1): 51–66.
- Corley, E, Wolosiuk, R.A., 1986.** The Effect Of Organic Solvents On The Activation and The Activity Of Spinach Chloroplast Fructose-1,6=bisphosphatas. *J Biol Chem* 260(7): 3978-3983.
- Çimen, Ç., Öter Ç., Demir H. ve Savran A. 2005.** Rat Eritrositlerinden Elde Edilen Katalaz Enziminin Karakterizasyonu ve Kinetiğinin incelenmesi, *Van YYÜ Veteriner Fakültesi Dergisi*, 16,15-20.
- Dağdelen, B., 2015.**İnflamasyonun Oksidatif Stres Üzerine Etkisinin Fare Böbrek Dokusunda Transkriptomik ve Proteomik Seviyede Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, Türkiye, 105s.
- Darroudi, S., Fereydouni, N., Tayefi, M., Ahmadnezhad, M., Zamani, P., Tayefi, B., Kharazmi, J., Tavalaei, S., Heidari-Bakavoli, A., Azarpajouh, M.R., Ferns, G.A., Mohammadpour, A.H., Esmaily, H., Ghayour-Mobarhan, M., 2019.** Oxidative Stress and İnflammation, Ttwo Features Associated With a High Percent Age Body Fat, and That May Lead To Diabetes Mellitus and Metabolic Syndrome. *Biofactors* 45(1): 35-42.
- Demirci, Ş., Gün, C., 2017.** Adipoz Doku ve Adipoz Dokudan Salınan Bazı Proteinler. *MAKU Sag Bil Enst Derg* 5(2):155-179.
- Dina, C., 2008.** New insights into the genetics of body weight. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2008;11:378-84.

- Englard, S., Seifter, S., 1990.** Methods in Enzymology. Precipitation Techniques (Ed: Abelsan, J.N., Simon, M.I.). California, 285-306.
- Fernandez-Sanchez, A., Madrigal-Santillan, E., Bautista, M., Esquivel-Soto, J., Morales-Gonzalez, A., Esquivel-Chirino, C., Durante-Montiel, I., Sanchez-Rivera, G., Valadez-Vega, C., Morales-Gonzalez, J.A., 2011.** Inflammation, Oxidative Stress and Obesity. *Int J Mol Sci* 12(5): 3117-3132.
- Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, Y., Nakayama, O., Makishima, M., 2004.** Increased Oxidative Stress in Obesity and Its Impact On Metabolic Syndrome. *J Clin Invest* 114: 1752-1761.
- Furuhashi, M., Fucho, R., Görgün, Z.C., 2008.** Adipocyte/macrophage fatty acidbinding proteins contribute to metabolic deterioration through actions in both macrophages and adipocytes in mice. *J Clin Invest.* 118:2640-50.
- Gaetani, G., Ferraris, A., Rolfo, M., Mangerini, R., Arena, S., Kirkman, H., (1996).** Predominant role of catalase in the disposal of hydrogen peroxide within human erythrocytes". *Blood* 87 (4): 1595–9. PMID 8608252.
- Gupta, M.N., 1992.** Enzyme Function in Organic Solvents. *Eur J Biochem* 203(1-2): 25-32.
- Ipar, N., 2012.** Ekzojen Obezitesi Olan Hastalarda Total Oksidatif Stres ve Total Antioksidan Kapasite Düzeyleri; Probiyotiklerin Bu Düzeylere Etkisi. Tıpta uzmanlık Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Eskişehir.
- Jung, U.J. ve Choi, M.S., 2014.** Obesity And its metabolic Complications: The Role of Adipokines and The Relationship Between Obesity, İnflammation, İnsulin Resistance, Dyslipidemia and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Int J Mol Sci* 15(4):6184-6223.
- Kahraman, C., 2013.** Diyetle İndüklenmiş Obezitede Yağ Dokusundaki Oksidan Antioksidan Dengenin İncelenmesi. Doktora Tezi. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, Türkiye, 87s.
- Karabulut, H. ve Gülay, M.Ş., 2016.** Antioksidanlar. Mehmet Akif Ersoy Veterinerlik Fakültesi Dergisi, 1, 65-76. DOI: 5000185894
- Kıyıcı, F., 2006.** Alp Disiplini Kayakçılarında Sürat Egzersizleri Sonrası Serum Süperoksit Dismutaz, Katalaz ve Malondialdehit Düzeylerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, Türkiye, 66s.
- Krishnaswamy, M., Kenkare, U.W., 1970.** Th Effect Of pH, Temperature, and Organic Solvents On The Kinetic Parameters of Escherichia Coli Alkaline Phosphatase. *J Biol Chem* 245(15):3956-3963.

- Krishnamurthy, P., Wadhvani, A., 2011.** Antioxidant Enzymes and Human Health Intechopen Books. DOI: 10.5772/48109
- Gimble, J.M., 2003.** Adipose tissue-derived therapeutics. *Expert Opin Biol Ther* 2003;3:705-13.
- Góth, L., Lenkey, A., William, N.B., 2001.** Blood Catalase Deficiency and Diabetes in Hungary *Diabetes Care*. 24 (10): 1839–1840. doi:10.2337/diacare.24.10.1839. PMID 11574451.
- Góth, L., 2008.** Catalase Deficiency and Type 2 Diabetes *Diabetes Care*. 24 (10): e93–e93. doi:10.2337/dc08-1607. PMID 19033415.
- Lobo, V., Patil, A., Chandra, N., 2010.** Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev*. 2010 Jul-Dec; 4(8): 118–126. DOI: 10.4103/0973-7847.70902.
- Maass, E., 1998.** How does the concentration of hydrogen peroxide affect the reaction. MadSci Network. . Retrieved 009-03-02.
- Machlin, L.J., Bendich, A., 1987.** Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *The FASEB Journal*. DOI: 1.6.3315807
- Mehta, S., Farmer, J.A., 2007.** Obesity and inflammation: A new look at an old problem. *Curr Atheroscler Rep*; 9:134-8.
- Mohseni, R., ArabSadeghabadi, Z., Goodarzi, M.T., Teimouri, M., Nourbakhsh M., Razzaghy Azar M., 2018.** Evaluation Of Mn-Superoxide Dismutase and Catalase Gene Expression in Childhood Obesity: Its Association With Insulin Resistance. *J Pediatr Endocrinol Metab*31(7):727-732.
- Özcan, O., Erdal, H., Çakırca, G., 2015.** Oxidative stress and its impacts on intracellular lipids, proteins and DNA. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*. 6 (3): 331-336. DOI: 10.5799/ahinjs.01.2015.03.0545
- Rao, S., Yamada, Y., Leung, K.Y., 2003.** A major catalase (KatB) that is required for resistance to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and phagocyte-mediated killing in *Edwardsiella tarda*. *Microbiology Reading, Engl*. 149 (Pt 9): 2635–2644. doi:10.1099/mic.0.26478-0. PMID 12949187.
- Sajic, T., Hopfgartner, G., Szanto, I., Varesio, E., 2011.** Comparison Of Three Detergent-Free Protein Extraction Protocols For White Adipose Tissue. *Anal Biochem* 415(2):215–217.
- Savini, I., Catani, M.V., Evangelista, D., Gasperi, V., Avigliano, L., 2013.** Obesity-Associated Oxidative Stress: Strategies Finalized To Improve Redox State. *Int J Mol Sci* 14(5): 10497-10538.

- Sies, H., 1991.** Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med.* 1991 Sep 30;91(3C):31S-38S. PMID: 1928209 DOI: 10.1016/0002-9343(91)90281-2
- Sumner, J. B., and Dounce, A. L., 1937.** Crystalline Catalase. *Science*, 85(2206), 366-367. doi: 10.1126/science.85.2206.366
- Süleyman, H., Gül, V., Erhan, E., 2018.** Oksidatif Stres ve Doku Hasarı. *Erzincan Tıp Dergisi* 1(1): 1-4.
- Tilg, H., Hotamışgil, S.G., 2006.** Nonalcoholic fatty liver disease: Cytokineadipokine interplay and regulation of insulin resistance. *Gastroenterology* 131:934-45.
- Vendel, A., 1988.** Enzymes Acting Against Reactive Oxygen. *Adv Clin Enzymol.* 61 6.161–167.
- Wiggers, H.J., Cheleski, J., Zottis, A., Oliva, G., Andricopulo, A.D., Montanari, C.A., 2007.** Effects Of Organic Solvents On The Enzyme Activity Of Trypanosoma Cruzi Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase in Calorimetric Assays. *Anal Biochem* 370(1):107-114.



## ÖZGEÇMİŞ

Sinem USTA, 31/07/1990 tarihinde İstanbul'da doğdu. İlköğretimini 2004 yılında İstanbul'da Çekmeköy İlköğretim Okulu'nda ve Ortaöğretimini 2008 yılında Ümraniye Lisesi'nde (YDA) tamamladı. 05/09/2008 tarihinde başladığı Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nden 15/06/2012 tarihinde mezun oldu. 2013 yılında Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Anorganik Kimya Bölümü'nde başladığı yüksek lisans öğreniminden 2016 yılında mezun olmuştur. 2015 yılında Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Bölümü'nde başladığı yüksek lisans öğrenimine halen devam ettirmektedir. Pakçaysan Poşet Ambalaj Gıda San. Tic. A.Ş. bünyesinde 2016 yılından beri sorumlu yönetici olarak görev yapmaktadır. Orta seviyede İngilizce bilmektedir.